

## 細胞外ATPの皮膚における役割に関する研究

著者	吉田 廣英
号	40
学位授与番号	7
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/36681">http://hdl.handle.net/10097/36681</a>

氏 名 (本籍)

よし                      だ                      ひろ                      ひで  
吉                      田                      廣                      英

学 位 の 種 類 博 士 (医 療 薬 学)

学位記番号 薬博（医療薬学）第7号

学位授与年月日 平成 18 年 9 月 1 日

学位授与の要件                      学位規則第4条第1項該当

研究科、専攻 東北大学大学院薬学研究科  
(博士課程) 生命薬学専攻

學位論文題目

細胞外 ATP の皮膚における役割に関する研究

論文審査委員	(主査)教授	中畑則道
	教授	今井潤
	教授	福永浩司

## 論文内容要旨

皮膚は面積にしてほぼ畳一枚分の  $1.6 \text{ m}^2$ 、重さにして  $3 \text{ kg}$  であり、皮下組織も加えると約  $9 \text{ kg}$  となる。したがって、皮膚は日本人の平均的な成人の体重である  $64.3 \text{ kg}$  の約  $14\%$  を占め、生体の中で最大の臓器と考えられる。皮膚は生体を被い、外界との境界となっているが、単なる包装紙や隔壁ではなく、火傷などで表皮の  $\frac{3}{10}$  を失えば、直ちに生命の危機にさらされることからわかるように、生命の保持に必要かつ不可欠な機能を有している。

皮膚の機能は大きく3つに分けられる。第1番目には体内の内部環境を保護するための防御壁、すなわちバリアーとしての役割が考えられる。たとえば、体液の保持のため、内部から外部へと体液が漏れないようにしたり、逆に、外部から水分の滲入や、物質の侵入防止作用を有している。細かなほこりなどの物質に加えて化学物質や、細菌類の侵入も防いでおり、また、紫外線からの防御（メラノサイトのメラニン色素による）も行っている。さらに、皮膚血管の拡張または収縮による放出熱の調節や、発汗による放熱を通して体温を調節している。第2番目には痛覚、触覚、熱感や冷感を通して、それらの外界からの刺激情報を、中枢神経系に伝える機能があげられる。これら感覚は生体が正常な機能を保持していく上で不可欠なものであり、痛みなどの機能が欠損すると、生体は危険を回避できず正常な状態を維持できなくなる。さらに第3番目として、皮膚組織は免疫反応の場として働くことがあげられる。すなわち、外部からの病原体やアレルギー性の異物を最初に認識し、抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞が免疫系へ情報を伝えている。この作用により、物理的なバリアーの機能に加えて、免疫系を介して病原体の侵入を防ぎ、内部環境維持に寄与している。

最近、皮膚を伸ばしたり縮ませたりするような物理的刺激により、皮膚を構成する細胞から ATP が放出されることが報告された。すなわち、真皮細胞（線維芽細胞）や表皮細胞（ケラチノサイト）は物理的ストレスに反応して ATP を放出することが示されている。このようにして放出された ATP は、オートクラインやパラクラインとしてケラチノサイト自身の調節や近傍の細胞に作用する可能性が示唆されているが、十分には解析が行われておらず、不明な点が多く残されている。

そこで、本研究では皮膚における細胞外 ATP の役割を明らかにすることを目的として、ヒトケラチノサイト由来で不死化され樹立された HaCaT 細胞を用いて、物理的刺激により HaCaT 細胞から ATP が遊離するか否かをはじめに検討し、次に HaCaT 細胞に発現して機能する ATP 受容体を特定するとともに、その受容体が刺激されたときに起きる生体反応としてインターロイキン-6 (IL-6) の生成について検討を加えた。

はじめに、培地交換した時の物理的ストレスによる HaCaT 細胞からの ATP の放出を、培地中の ATP 濃度をルシフェリン-ルシフェラーゼ法により測定することで検討した。その結果、培地交換によって HaCaT 細胞から ATP が瞬時に放出され、交換前の約 62 倍の濃度に達した。その後、時間経過とともに徐々に減少したが、培地交換 3 時間後においても一定レベルの ATP が培地中に残存した。すなわち、物理的刺激によって HaCaT ケラチノサイトから ATP が放出することが明らかになった。

次にケラチノサイトから放出された ATP の作用する受容体を検討するために、HaCaT 細胞に発現している P2 受容体のサブタイプを RT-PCR 法にて解析した。その結果、HaCaT 細胞には P2X としては P2X<sub>5</sub> と P2X<sub>6</sub> の mRNA 発現が認められ、P2Y としては P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub> の mRNA 発現が観察された。そこで、HaCaT 細胞に発現する機能的な P2 受容体を明らかにするために、各種 ATP アナログで刺激したときの HaCaT 細胞内の  $[Ca^{2+}]_i$  を測定し、それら ATP アナログの作用強度を調べた。その結果、 $[Ca^{2+}]_i$  上昇の作用強度は UTP > ATP > UDP > ADP > BzATP >  $\alpha\beta$ -MeATP の順であった。P2X 受容体刺激効果が強いとされるアゴニストの BzATP や  $\alpha\beta$ -MeATP の作用が弱かったことより、機能的な  $[Ca^{2+}]_i$  上昇には P2X 受容体はあまり関与していないものと考えられた。しかし、UTP, ATP, UDP や ADP などの P2Y 受容体刺激効果が強いとされるアゴニストの活性が高かったことから、P2Y 受容体が  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に関与しているものと推定された。その中でも、UTP および ATP が特に強く反応することから、P2Y 受容体の中で P2Y<sub>2</sub> および P2Y<sub>4</sub> 受容体に関与していることが示唆された。ATP や UTP の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇作用は外液  $Ca^{2+}$  を除去した条件でも認められたことから、P2Y 受容体のシグナル伝達である G<sub>q/11</sub> の活性化、ホスホリパーゼ C の活性化によるイノシトールリン脂質水解に伴うジアシルグリセロールとイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP<sub>3</sub>) の生成、IP<sub>3</sub> による細胞内  $Ca^{2+}$  貯蔵部位である小胞体からの  $Ca^{2+}$  遊離によっていることが示唆された。確かに、ATP と UTP は用量依存的なイノシトールリン脂質代謝回転を促進し、その用量依存性は  $[Ca^{2+}]_i$  上昇とほぼ一致した。一方、前述した RT-PCR の結果において P2Y<sub>2</sub> の存在は認められたものの P2Y<sub>4</sub> の存在は示されなかったことから、 $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を引き起こす P2Y 受容体は主として P2Y<sub>2</sub> 受容体であることが示唆された。

最後に、HaCaT 細胞において P2Y<sub>2</sub> 受容体が活性化されたときに引き起こされる生理反応を明らかにするために、IL-6 の生成について検討を加えた。UTP で HaCaT 細胞を刺激すると、30 分から 60 分でピークとなる IL-6 mRNA の劇的な増加が引き起こされた。IL-6 タンパク質の生成放出も 3 時間でピークに達する増加が観察された。UTP による  $[Ca^{2+}]_i$  濃度の上昇、イノシトールリン脂質水解反応、IL-6 mRNA 量の増加および IL-6 タンパク質の生成放出反応の EC<sub>50</sub> は 0.5 ~ 2.0  $\mu$ M であり、それぞれの反応ではほぼ同様であった。この UTP による IL-6 mRNA 増加や IL-6 タンパク質の生成増加は、P2 受容体遮断薬であるスラミンによって有意な抑制を受け、P2 受容体を介した反応であることが示された。すなわち、上記の一連の現象は互いに連携しており、おそらく P2Y<sub>2</sub> 受容体の活性化に起因することが示唆された。一方、mRNA の転写を抑制するアクチノマイシン D を HaCaT 細胞に作用させると、UTP 刺激による IL-6 mRNA の発現が抑制された。すなわち、UTP 刺激は IL-6 mRNA の転写を活性化して IL-6 mRNA の発現増加をもたらすものであり、IL-6 mRNA の安定性の増大（分解の阻害）によるものではないことが示唆される。一方、細胞内  $Ca^{2+}$  キレート剤の BAPTA-AM を作用させると UTP による IL-6 mRNA 増加は顕著に抑制された。すなわち、P2Y<sub>2</sub> 受容体の活性化による G<sub>q/11</sub>-ホスホリパーゼ C を介する  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇によって、IL-6 の産生が引き起こされている可能性が示唆された。UTP 刺激による IL-6 mRNA の発現増加に対して、PKC 抑制薬の GF109203X は無効であった。すなわち、 $[Ca^{2+}]_i$  の増加が IL-6 mRNA 転写に関与しているものの、PKC の関与は少ないものと考えられる。したがって、HaCaT ケラ

チノサイトにおける P2Y<sub>2</sub> 受容体刺激は、G<sub>q/11</sub> - PLC 系を活性化し、その結果生成した IP<sub>3</sub> による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を介して IL-6 mRNA 転写の活性化が引き起こされるものと推定された。本研究の結果をまとめると、ケラチノサイトは物理的的刺激に応答して ATP を大量に分泌し、その ATP はオートクライン的にケラチノサイトに存在する P2Y<sub>2</sub> 受容体を刺激するものと考えられる。このケラチノサイトにおける P2Y<sub>2</sub> 受容体刺激は G<sub>q/11</sub> - PLC 系を活性化して、IP<sub>3</sub> による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇をもたらし、その結果、IL-6 の遺伝子発現を増加させて IL-6 タンパク質の生合成を促進し、その放出を増加させることを明らかにした。

皮膚が引き伸ばされたり圧迫されたりする物理的な刺激や、外傷や火傷など皮膚が損傷を受けてケラチノサイトが死んでいく場合には、今回の実験結果から推定されるように、ケラチノサイトから大量の ATP が放出されることが考えられる。ATP はケラチノサイトの P2Y<sub>2</sub> 受容体の活性化を引き起こし、その結果、急速な IL-6 の生合成が促進されて IL-6 が放出されるものと思われる。この IL-6 により、皮膚組織における炎症状態が引き起こされることが考えられる。しかし最近、IL-6 は感覚神経の機能回復や炎症の修復過程に関与することが報告されており、ケラチノサイトから遊離した IL-6 の役割は必ずしも明瞭になっているとはいえ、今後の研究の進展が望まれる。皮膚は、生体にとっての最大の臓器であり、外界との接点である。したがって、皮膚の機能の解明は個体の維持機構の本質的な解明にも繋がるものと期待される。今後、正常あるいは炎症状況下の皮膚組織において ATP がどのような役割を担っているのかを明らかにすることを通して、皮膚における ATP の関与する病態を解明し、さらに、その病態を改善する皮膚機能障害治療薬の開発へと進展していくことが期待される。

## 審査結果の要旨

皮膚は生体の中で最大の臓器であり、生命の保持に必要かつ不可欠な機能を有している。皮膚の機能は大きく3つに分けられる。すなわち、第1番目には体内の内部環境を保護するための防御壁、すなわちバリアーとしての役割、第2番目には痛覚、触覚、熱感や冷感を通して、それらの外界からの刺激情報を、中枢神経系に伝える機能があげられる。さらに第3番目として、免疫反応の場として働くことがあげられる。最近、皮膚を伸ばしたり縮ませたりするような物理的刺激により、皮膚を構成する細胞からATPが放出されることが報告されたが、その役割に関しては不明な点が多く残されている。そこで、本研究ではヒトケラチノサイト由来で不死化され樹立されたHaCaT細胞を用いて、皮膚における細胞外ATPの役割を明らかにすることを目的とした。

はじめに、培地交換した時の物理的ストレスによるHaCaT細胞からのATPの放出を、培地中のATP濃度をルシフェリン-ルシフェラーゼ法により測定することで検討した結果、HaCaTケラチノサイトからATPが放出することが明らかになった。

次にケラチノサイトから放出されたATPの作用する受容体サブタイプをRT-PCR法にて解析するとともに、各種ATPアナログで刺激したときのHaCaT細胞内の $[Ca^{2+}]_i$ の作用強度を調べた。その結果、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を引き起こすP2Y受容体は主としてP2Y<sub>2</sub>受容体であることが示唆された。

最後に、HaCaT細胞においてP2Y<sub>2</sub>受容体が活性化されたときに引き起こされる生理反応を検討した。P2Y<sub>2</sub>受容体アゴニストのUTPでHaCaT細胞を刺激すると、遺伝子発現を介したIL-6タンパク質の生成増加が見られた。UTPによるIL-6タンパク質の生成増加はP2受容体遮断薬であるスラミンによって有意な抑制を受け、UTPはイノシトールリン脂質水解反応、および $[Ca^{2+}]_i$ 濃度の上昇を引き起こした。一方、細胞内Ca<sup>2+</sup>キレート剤のBAPTA-AMを作用させるとUTPによるIL-6 mRNA増加は顕著に抑制されたが、PKC抑制薬のGF109203Xは無効であった。すなわち、P2Y<sub>2</sub>受容体の活性化によるG<sub>q/11</sub>-ホスホリパーゼCを介する $[Ca^{2+}]_i$ の上昇によって、IL-6の産生が引き起こされている可能性が示唆された。以上のように、ケラチノサイトは物理的刺激に応答してATPを大量に分泌し、そのATPはオートクライン的にケラチノサイトに存在するP2Y<sub>2</sub>受容体を刺激するものと考えられる。このケラチノサイトにおけるP2Y<sub>2</sub>受容体刺激はG<sub>q/11</sub>-PLC系を活性化して、IP<sub>3</sub>による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇をもたらし、その結果、IL-6の遺伝子発現を増加させてIL-6タンパク質の生合成を促進し、その放出を増加させることを明らかにした。

したがって、本論文は皮膚におけるATPの役割の一端を明らかにした重要な研究であり、今後の皮膚機能の解明に繋がるものと期待されることから、博士（医療薬学）の学位論文として合格と認める。